

特表平7-502497

第3部門第2区分

(43)公表日 平成7年(1995)3月16日

(51)Int.Cl.*	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 K 39/395	W	9284-4C	
C 0 7 K 1/34			
16/00		8318-4H	
G 0 1 N 33/531	B	8310-2J	
// C 1 2 P 21/08		9161-4B	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 9 頁)

(21)出願番号 特願平5-507258
 (86) (22)出願日 平成4年(1992)10月27日
 (85)翻訳文提出日 平成6年(1994)4月27日
 (86)国際出願番号 PCT/GB92/01970
 (87)国際公開番号 WO93/08837
 (87)国際公開日 平成5年(1993)5月13日
 (31)優先権主張番号 9122820.5
 (32)優先日 1991年10月28日
 (33)優先権主張国 イギリス (GB)
 (81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, SE), AU, CA, JP, US

(71)出願人 ザ・ウエルカム・ファウンデーション・リミテッド
 イギリス国、エヌダブリュ1・2ビービー、ロンドン、ユーストン・ロード 160、ユニコーン・ハウス
 (72)発明者 スミス、マージョリー
 イギリス国、ビーアール3・3ビーエス、ケント、ベッケンハム、ラングレイ・コート (番地なし)
 (72)発明者 リベロス・ロジャス、バレンティナ
 イギリス国、ビーアール3・3ビーエス、ケント、ベッケンハム、ラングレイ・コート (番地なし)
 (74)代理人 弁理士 鈴江 武彦 (外3名)

(54)【発明の名称】 安定化抗体

(57)【要約】

この発明は、少なくとも1種の免疫グロブリンを、EDTAもしくはクエン酸塩のような銅イオンキレート剤の安定化量と共に含有する安定化免疫グロブリン組成物に関する。好ましくは、免疫グロブリンは、例えばCD₄₅2抗原に対する組換えCDR-グラフト化抗体のような抗体、最も好ましくはCAMPATH-1Hである。この発明はまた、免疫グロブリンの安定性を増強する方法であって、免疫グロブリンに、それらから銅イオンを除去することが可能な精製手順を施すことを包含する方法にも関する。好ましくは、免疫グロブリンは、例えば原子吸光分光分析で検出可能な銅イオンを実質的に含有しないものとなる。

BEST AVAILABLE COPY

請求の範囲

1. 少なくとも1種の免疫グロブリンを、安定化量の銅イオンキレート剤と共に含有する安定化免疫グロブリン組成物。
2. 免疫グロブリンがクラス1 gの免疫グロブリンである請求の範囲第1項記載の組成物。
3. 免疫グロブリンが組換えCDR-グラフト化抗体である請求の範囲第1項または第2項に記載の組成物。
4. 抗体が、CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD11a、b、CD18、CD19、CD25、CD33、CD52またはCD54抗原に対する抗体である請求の範囲第3項記載の組成物。
5. 抗体がCD52抗原に対する抗体である請求の範囲第3項記載の組成物。
6. 抗体がCAMPATH-1Bである請求の範囲第5項記載の組成物。
7. 銅イオンキレート剤がエチレンジアミン四酢酸である請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載の組成物。
8. 銅イオンキレート剤がクエン酸イオンである請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載の組成物。
9. 非経口投与に適した液体製剤の形態にある請求の範囲第1項ないし第8項のいずれか1項に記載の組成物。
10. 非経口投与に適した液体製剤に戻すことに適合する凍結乾燥形態にある請求の範囲第1項ないし第8項のいずれか1項に記載の組成物。

明 細 書

安定化抗体

この発明は、分解、特に保存時および使用に先立つ処理の際の分解に対する免疫グロブリンの安定化に関する。

抗体もしくは免疫グロブリンは、二官能性タンパク分子である。異なる抗体の間で高度に変化し得る一方の部位は、第二の定常部位が細胞のFC受容体への結合の要因であり、また細胞を活性化するのに対し、抗原、例えば生体が遭遇し得る多くの異なる感染因子に結合する要因である。このように、抗体は、外来微生物およびウイルスの破壊における哺乳動物の免疫応答の生体成分を代表する。

抗原を用いて動物を免疫することで、異なる特異性および親和性を有する異なる抗原の産生が生じる。したがって、免疫動物から得られる抗血清は異種抗血清であり、多くの異なるリンパ球クローンによって産生される抗体プールを含む。このようにして得られる抗体はポリクローナル抗体と呼ばれ、このポリクローナル性は、診断アッセイおよび治療用途での抗体の使用における主な欠点であった。

1975年、Kohlerおよび Milstein (Nature, 1975, 256, 495-497) が、抗原で免疫したマウスからの脾臓細胞とネズミミエローマ体の細胞との融合の成功を報告したとき、大きなステップが前方に踏み出された。ハイブリドーマと呼ばれる得られた雑種細胞は、脾臓細胞由来の抗体産生能力を育し、ミエローマ細胞に由来して連続増殖性である。各ハイブリドーマは、元の抗原の特定の決定基に対する単一の抗体を合成

11. 保存時の分解に対する免疫グロブリンの安定化への銅イオンキレート剤の使用。
12. 銅イオンキレート剤がエチレンジアミン四酢酸である請求の範囲第11項記載の使用。
13. 銅イオンキレート剤がクエン酸塩である請求の範囲第11項記載の使用。
14. 抗体がCD52抗原に対する組換えCDR-グラフト化抗体である請求の範囲第11項ないし第13項のいずれか1項に記載の使用。
15. 抗体がCAMPATH-1Bである請求の範囲第14項記載の使用。
16. 免疫グロブリンに、それらから銅イオンを除去することが可能な精製手順を施すことを包含する免疫グロブリンの安定性の増強方法。
17. 精製手順が、リン酸緩衝液を含有するシアン化カリウムに対する透析と、それに続く、銅をシアン化銅として除去するためのゲル濾過である請求の範囲第16項記載の方法。
18. 実質的に銅イオンを含有しない精製免疫グロブリン。
19. 原子吸光分光分析によって銅を検出することができない精製免疫グロブリン。
20. CD52抗原に対する組換えCDR-グラフト化抗体である請求の範囲第18項または第19項に記載の免疫グロブリン。
21. 抗体がCAMPATH-1Bである請求の範囲第20項記載の免疫グロブリン。

し、分泌する。培養物中の全ての細胞が同一である、すなわちそれらが独特の抗体種の合成に必要な遺伝情報を有していることを確実にするために、細胞融合の結果得られたハイブリドーマのクローニングおよびサブクローニングを行なう。このように、クローン化ハイブリドーマは、同種抗体もしくはモノクローナル抗体を産生する。

ハイブリドーマ科学の利点は深遠である。各脾臓から生じる多くの雑種を目的の抗原に対する抗体の産生能力についてスクリーニングし、わずかに数種を選別するため、純粋ではない抗体を用いて免疫し、さらには特異抗体を得ることさえも可能である。この細胞体の不死性は、よく特徴付けられた同種抗体を、特に病理学的疾患の診断および免疫療法を含む種々の用途に無限に供給して使用することを可能にする。不幸にして、臨床環境におけるそのような抗体の有用性は、ヒト抗マウス抗体の発現（抗グロブリン反応）によって極度の妨げられることがあり、これが治療を妨害したり、あるいはアレルギーや免疫複合体過敏症を引き起こしたりすることがある。

抗体分子は、鎖間のジスルフィド結合によって互いに保持される2本の軽鎖と2本の重鎖とからなる。各々の軽鎖はジスルフィド結合によって重鎖に連結し、2本の重鎖はジスルフィド結合によって互いに連結している。各重鎖はその一端に可変ドメインとそれに続く幾つかの定常ドメインを有し、各軽鎖はその一端に可変ドメインを、他端に定常ドメインを有する。軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと並列し

ている。軽鎖定常ドメインは、重鎖の第1定常ドメインと並列している。重鎖の残りの定常ドメインは、互いに並列している。軽鎖および重鎖の定常ドメインは、抗原に対する抗体の結合には直接関与しない。

軽鎖および重鎖の対の各々の可変ドメインは、抗原結合部位を形成する。これらは、各ドメインがフレームワーク領域を含む同様の一般構造を有する。このフレームワーク領域は、その配列が比較的保全され、3つの相補性決定領域(CDR)によって連結される4つの領域からなる。4つのフレームワーク領域は β -シート・コンホメーションを大幅に取り入れ、CDRは β -シート構造を結合し、時にはその一部を包含するループを形成する。CDRは、フレームワーク領域によって非常に接近した状態に保持され、他のドメインからのCDRと共に抗原結合部位の形成に寄与する。

ネズミモノクローナル抗体の使用において、ヒト抗マウス抗体反応の誘発は、ネズミ起源の定常ドメインおよび4つのフレームワーク領域によるものである。したがって、この問題は、2種類の基本型の変性抗体の開発によって処理されている。第1の型はキメラ抗体と呼ばれ、ネズミ定常ドメインのみがヒト起源の同等ドメインによって置換されたものである(Morrison et al., *P.N.A.S.*, 1984, 81, 6851-6855;

Boulianne et al., *Nature*, 1985, 314, 268-270;および

Neuberger et al., *Nature*, 1985, 314, 268-270)。第2の型は、ネズミ定常ドメインおよびネズミフレームワーク領域が全てヒト起源の同等ドメインおよび領域によって置換さ

れたものである。この第2の型の変性抗体は、ヒト化もしくはCDR-グラフト化抗体と呼ばれている(Jones et al., *Nature*, 1986, 321, 522-525;および Richman et al., *Nature*, 1988, 332, 323-327)。

完全な臨床研究に十分な量の抗体を産生させるためには、効率のよい組換え発現系を利用することが望ましい。ミエローマ細胞は、抗体産生および分泌に特化した天然ホストを代表するものである。これらから誘導された細胞系が組換え抗体の発現に用いられている。時には、免疫グロブリン調節要素周辺に基づく複合ベクターの設計が必要となり、大きく変化した最終発現レベルが報告されている(Winter et al., *Nature*, 1988, 332, 323-327; Wiedle et al., *Gene*, 1987, 60, 205-216; Nakatani et al., *Bio/Technology*, 1989, 7, 805-810;および Gillies et al., *Bio/Technology*, 1989, 7, 799-804)。

抗体について提案されている他の型の発現系には不死化ヒトB細胞が含まれる(Rice et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1982) 79, 7862-7865)が、一般に収率が低く、安定な細胞系を確立することが困難である。*E. coli*がF₁フラグメント(Sterisおよび Flathman, *Science*, (1988) 240, 1038-1041)もしくは一重鎖抗原結合分子(Bird et al., *Science*, (1988) 242, 423-426)の発現に用いられているが、現時点ではこの系において完全な免疫グロブリンは産生されていない。しかしながら、抗体は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞のような組換えタンパク質の産生

で公知の哺乳動物発現系においてうまく産生されている。

治療もしくは診断のいずれかの用途に用いられる精製抗体の産生においては、抗体が、保存時並びに抗体の安定性に悪影響を及ぼし得る種々の化学物質に対して十分に安定であることが重要である。この発明は、痕跡量の銅(Cu^{++})が保存時の免疫グロブリン分子に対する脱安定化作用を有し、この作用が免疫グロブリン分子を適切な銅イオンキレート剤と一緒に処方することにより除去し得るという驚くべき発見に基づいている。

驚くべきことに、免疫グロブリンが原子吸光分光分析のような通常の技術で検出し得る量の銅を含有しない場合であっても、銅イオンキレート剤の存在が免疫グロブリン分子に対する安定化作用を示すことがあることも見出されている。特定の理論で区切りをつけることを望むものではないが、原子吸光分光分析のような技術の検出限界を下回る量の銅イオンの存在が、適切なキレート剤を添加することにより除去することができる免疫グロブリンに対する脱安定化作用を依然として有している可能性がある。

この発明は、少なくとも1種の免疫グロブリンを、安定化量の銅イオンのキレート剤と一緒に含有する安定化免疫グロブリン組成物を提供する。

この発明はまた、免疫グロブリンの保存時の分解、例えば銅イオンの作用の結果としての分解に対する安定化への銅イオンのキレート剤の使用を提供する。

痕跡量の銅イオンが免疫グロブリンに対する脱安定化作用

を有するという事実は、安定性の見地から、免疫グロブリンが最少可能量の銅イオンを含有することを確証するという利点があり得ることをも意味する。さらなる側面によると、この発明は、実質的に銅イオンを含有しない精製免疫グロブリンを提供する。特に、この発明は、原子吸光分光分析のような通常の技術を使用しても銅を検出することができない免疫グロブリンを提供する。

この発明はまた、免疫グロブリンの安定性を増強する方法であって、免疫グロブリンに、それらから銅イオンを除去することが可能な精製手順を施すことを包含する方法を提供する。特に、この手順は、原子吸光分光分析のような通常の手続きの使用によっても免疫グロブリン中に銅を検出することができないようなものであるべきである。銅は、タンパク精製の分野において公知の通常の手順、例えば、シアン化カリウム含有リン酸緩衝液に対する透析とこれに続くゲル濾過で銅をシアン化銅として除去する手順(例えば、Baker and Bullquist, *J. Biol. Chem.*, 253, 844-845 (1978)を参照)によって、免疫グロブリンから除去することができる。

この発明は、全てのクラスの免疫グロブリン、すなわちIgM、IgG、IgEおよびIgDの安定化に適用することが可能であり、Fabおよび二重特異性抗体の安定化に拡張することも可能である。この発明は、サブクラスIgG₁、IgG_{2A}、IgG_{2B}、IgG₃およびIgG₄を含むクラスIgGの免疫グロブリンの安定化に適用することが好ましい。この発明は、クラスIgG₁の免疫グロブリンの安定化に適

用することがより好ましい。

この発明は、特に組換え抗体の安定化、最も詳しくはキメラ抗体もしくはヒト化(CDR-グラフト化)抗体の安定化にその用途を見出す。これらの詳細な例には、CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD11、 δ 、CD18、CD19、CD25、CD33、CD54に対するキメラもしくはヒト化抗体および、特に、CD*52抗原に対するヒト化抗体、例えば CAMPATH-1B (CAMPATH はウェルカム企業グループの商標)が含まれる。さらなる例には、種々の腫瘍細胞マーカー抗原に対するキメラもしくはヒト化抗体が含まれる。

一般に、免疫グロブリンは、早期段階、例えば精製中もしくは精製直後に、金属イオンキレート剤と処方される。免疫グロブリンの産生手順は、一般に、クロマトグラフィおよび/またはゲル濾過カラムによる精製を包含する。キレート剤は、精製手順の都合のよい段階、例えば、精製手順の終了時に免疫グロブリン中にキレート剤が残留するように、最終カラムの段階で添加することができる。その代わりに、キレート剤は、精製に続く適切な段階で添加することができる。凍結乾燥免疫グロブリンの場合には、キレート剤は、一般に、凍結乾燥の前に添加する。

免疫グロブリンに添加するキレート剤のレベルは、存在するいかなる銅もキレート剤に結合し、それにより免疫グロブリンの脱安定化においてそれらが無効になることを保証するようなものである。用いられるキレート剤は、目的とする免

疫グロブリンの最終用途に対する悪影響を持たないように選択されるべきではあるものの、この発明は目的とする免疫グロブリンの最終用途に関係なく適用することができる。例えば、治療用途を目的とする抗体の場合には、キレート剤はそれが存在するであろうレベルで毒性作用を示すべきではない。

特に好ましい金属イオンキレート剤は、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)であり、これは、典型的には、0.05mMないし5mM、好ましくは0.1mMないし3mMのレベルで免疫グロブリンに添加することができる。ヒトへの投与を目的とする免疫グロブリンの場合に、EDTA 0.1mMのレベルは、しばしば免疫グロブリンの安定化に十分なものであるが、2mMまで、もしくはそれ以上のレベルは生理学的になら問題を示さない。代替りの金属イオンキレート剤は、好ましくはアルカリ金属クエン酸塩の形で用いられるクエン酸イオン、例えばクエン酸ナトリウムである。

治療用途を目的とする免疫グロブリンは、一般に、医薬製剤の形態で患者に投与される。そのような製剤には、免疫グロブリンに加えて、生理学的に許容し得る担体または希釈剤が、おそらくは1種以上の他の薬剤、例えば他の免疫グロブリンもしくは抗生物質のような薬剤と混合して、好ましく含まれる。適切な担体には、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水グルコースおよび緩衝生理食塩水が含まれるが、これに限定されるものではない。これに代えて、免疫グロブリンを凍結乾燥し、必要に応じて使用するために上述の緩衝水溶液を添加することによりもどすことでも

きる。投与経路は、静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内注射もしくは経口を含む所定の非経口投与である。キレート剤は、保存および配布または最終用途のいずれかを目的とするいかなるタイプの免疫グロブリン製剤にも組み入れることができる。医薬製剤は一般に、凍結乾燥製品の場合にはもどされて、単位投与量当たり有効治療投与量の免疫グロブリンを含有する。ヒト化抗体 CAMPATH-1B の場合には、液体製剤またはもどされた凍結乾燥製剤は、好ましくは抗体 0.5ないし20mg/ml、好ましくは2mg/mlもしくは10mg/mlを含有する。

この発明を以下の例によって説明する。

例 1

組換え抗体の安定性に及ぼす種々の添加物の効果を37℃で研究した。抗体は、CD*52抗原に対するヒト化抗体である CAMPATH 1B (Riechmann et al., Nature, 322, 323-327 (1988))であり、これは抗体分子の重鎖および軽鎖をコードするDNAで形質転換された組換えCHO細胞系における発現により産生されたものである。この抗体を細胞培養精液から抽出して精製した後、リン酸緩衝生理食塩水溶液(1mg/ml)として4℃で保存した。

上記 CAMPATH 1B の溶液 0.5ml を特定の添加物と共に収容するバイアルを、無菌条件下において、+37℃で(週間インキュベートした。この期間の最後に試料をサイズ排除HPLCで分析し、試料の安定性を、全溶出タンパク質に基づく

「ピークC」(約50Kの分子量を有する抗体の主要分解生成物によって形成されるピーク)の形成の程度により評価した。

表 1

添加物	% ピークC
なし	12%
なし(+4℃での保存)	2%
Cu ⁺⁺ (10ppm)	28%
EDTA (2mM)	<1%
1,10-フェナントロリン (10mM)	3%

銅はCuCl₂ · 2H₂Oとして、1,10-フェナントロリンは2%(v/v)エタノールを含有する水溶液として添加した。

これらの結果は、銅が、対照と比較して、抗体の分解の程度を増強することを示している。EDTAの添加は、他の金属イオンキレート剤である1,10-フェナントロリンが分解を相当程度減少させるのに対して、實質的に分解を排除する。

例 2

この例もまた、例1において言及されるタイプのCHO細胞で産生される CAMPATH 1B (リン酸緩衝生理食塩水中11.1mg/ml)を用い、このバッチは1ml当たり0.04μgの

pH	% ピークC		
	Cu	EDTA	緩衝液
6.0	1.75	0.38	0.69
6.4	2.94	0.34	0.72
6.8	5.31	0.51	1.12

この結果は、pHの増加に従い、CAMPATH 18の分解に及ぼす銅の作用が高まることを示している。銅を添加しない場合においても、pHの増加に従って%ピークCの増加が見られる。EDTAの存在下では、CAMPATH 18の分解は抑制される。

例 3

この例は、例1において言及されるタイプのCHO細胞で産生されるCAMPATH 18の2種類の異なるバッチ(リン酸緩衝生理食塩水中10mg/ml)を用いた: バッチ1は原子吸光分光分析の測定による検出可能なCu²⁺を含有せず、バッチ2は1ml当り0.04μgのCu²⁺を含有する。両バッチの試料をリン酸緩衝生理食塩水中に1mg/mlに希釈して、50mM炭酸水素アンモニウムに対して4℃で24時間徹底的に透析し、さらにバッチ2に1mM EDTAを添加して銅の作用を除去した。両バッチのアリコート200μlを4、10、20、30、40、50および62℃で24時間インキュベートし、分解

Cu²⁺を含有するものと測定された。この例並びに以下の例において、抗体試料の銅含量はフィリップスPU9400X原子吸光分光光度計を用いる原子吸光分光分析により測定した。この方法の検出限界は約0.03μg Cu/mlなので、「検出可能な銅を含有しない」と称する試料は1ml当り0.03μg未満のCuを含有する。このCAMPATH 18の試料をリン酸緩衝生理食塩水中に1mg/mlとなるように希釈し、pH 6.0、pH 6.4およびpH 6.8の0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液に対して徹底的に透析した。CAMPATH 18は、事前に、pH 6で熱による分解に対して最も安定であることが測定されていた。各pHにおいて、試料300μl以下の物質:

(i) 水中10mMのCuCl₂・2H₂O 30μl;

(ii) 水中10mMのEDTA 30μl;

(iii) 緩衝液30μl;

を添加し、試料を62℃で24時間インキュベートした。アリコート50μlを例1と同様に分析した。すなわち、分解をサイズ排除クロマトグラフィーにより評価し、全溶出タンパク質に基づく「ピークC」の形成の程度として測定した。

%ピークCの結果を下記表2に示す。

を例1に記載されるようにサイズ排除クロマトグラフィーにより評価し、全溶出タンパク質に基づく「ピークC」の形成の程度として測定した。

%ピークCの結果を下記表3に示す

表 3

温 度	% ピークC	
	バッチ 1	バッチ 2 + EDTA
4°C	0	0
10°C	0	0
20°C	0	0
30°C	0.47	0
40°C	2.71	0
50°C	60.1	0
62°C	72.16	1.12

バッチ1においては検出可能なCu²⁺は見出されなかったが、30および40℃でのインキュベーションについては緩やかな分解が明らかであり、50および62℃では広範な分解があった。検出可能なCu²⁺を含有するバッチ2の場合には、EDTAの存在下で、昇温時であっても最小限度の分解が見られた。これらの結果は、検出可能以下のレベル (nondetectable

levels) のCu²⁺がCAMPATH 18の分解を促進する可能性を示唆している。

例 4

例1の結果を、CHO細胞において産生された同じCAMPATH 18抗体を用いて、62℃で24時間にわたる計時インキュベーションにより確認した。用いたバッチは、原子吸光分光分析により1ml当り0.03μgのCu²⁺を含有することが測定された。リン酸緩衝生理食塩水中に3.7mg/mlのCAMPATH 18を含有するこのバッチを、3×7リットルの50mM炭酸水素アンモニウムに対して4℃で24時間透析した。アリコート100μlを下記添加物と共に62℃でインキュベートした:

(i) 0.01M EDTA 5μl (水中) +

0.1M CuCl₂・2H₂O 10μl (水中);

(ii) 0.01M EDTA 5μl (水中);

(iii) なし。

添加するEDTAの量は、抗体中のいかなる残留遷移金属イオンをもキレートするに十分ではあるが、試料(ii)において添加される銅をキレートするには十分ではないものであるべきである。

試料50μlを、分析のため、0、1、2、3、4、5および24時間で抜き取った。これらの試料を、サイズ排除HPLCにより、抗体が分解している程度の指標として得られるピークCの形成の程度を用いて、例1と同様に分析した。その結果を下記表4に示す。

表 4

時 間 (時)	% ピークC		
	EDTA + Cu	EDTA	なし
0	0	0	0
1	2.49	0	1.13
2	9.20	0	1.82
3	39.24	0	3.27
4	44.83	0	5.13
5	49.42	0	6.89
24	100	2.25	22.12

例 5

この例もまた、例1において言及されるタイプのCHO細胞で産生される CAMPATH 1B (リン酸緩衝生理食塩水中10.0 mg/ml) および原子吸光分光分析による測定で検出可能な銅を含有しないバッチを用いた。この CAMPATH 1B の試料を50mM炭酸水素アンモニウムに対して4℃で透析し、アリコート 100 μ lを増加する濃度の $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (水中) 10 μ lと共に62℃で24時間インキュベートした。これらの試料を、サイズ排除HPLCにより、抗体が分解している程度の指標として得られるピークCの形成の程度を用いて、

いた。このため、この試料は高い銅含量を有し(銅/CAMPATH 1B モル比 449 μ モル Cu^{2+} /nモル CAMPATH 1B)、早期の安定性研究はこのバッチが31℃での保存時に実質的な分解を受けていることを示した。

この試料の、2mM EDTAの存在および非存在下における、31℃での4週間までのインキュベーションの効果を下記表6に示す。これらの試料を、サイズ排除HPLCにより、抗体が分解している程度の指標として得られるピークCの形成の程度を用いて、例1と同様に分析した。

表 6

時 間 (週)	% ピークC	
	2 mM EDTA	EDTAなし
1	0.72	2.86
2	1.26	6.59
3	1.24	9.24
4	1.44	10.18
4 at +4℃	0.95	1.02

2mM EDTAは CAMPATH 1B の分解を実質的に減少させるが、それを完全に阻止することはない。

同じ CAMPATH 1B の試料を50mM炭酸水素アンモニウムに

例1と同様に分析した。結果を下記表5に示す。

表 5

nモル CAMPATH 1B 当りのnモルCu	% ピークC
0	1.61
0.018	8.09
0.037	11.41
0.074	13.61
0.145	17.59
0.293	22.84

分解の程度は、 Cu^{2+} /CAMPATH 1B のモル比の増加に伴って増加することが見出された。0.3を超える比率(データは示さず)では、全タンパク質の回収率をより低いものとする凝集が見られた。

例 6

この例もまた、例1において言及されるタイプのCHO細胞で産生される CAMPATH 1B (リン酸緩衝生理食塩水中 1.0 mg/ml)を用い、バッチは原子吸光分光分析による測定で1ml当り0.19 μ gの Cu^{2+} を含有することが見出されて

対して4℃で透析し、アリコート 100 μ lを濃度を変化させたEDTAと共に62℃で24時間インキュベートした。これらの試料を、サイズ排除HPLCにより、抗体が分解している程度の指標として得られる「ピークC」の形成の程度を用いて、例1と同様に再度分析した。2つの別々の実験の結果を下記表7および8に示す。

表 7

mM EDTA	% ピークC
0	6.86
0.1	1.03
1	1.38
2	1.12
3	1.26
4	1.04
10	1.20

表 8

mM EDTA	% ピーク C
0	7.47
0.0001	8.43
0.001	7.28
0.01	1.83
0.04	1.68
0.1	1.63

これらの結果は、0.01mM EDTA程度の少量で CAMPATH 1B の分解を有効に阻害することを示す。

例 7

種々の抗体の分解に及ぼす Cu^{2+} および EDTA の効果を下記表 9 に示す。全ての試料は、あらゆる添加物の非存在下において 4℃ および 62℃ で 24 時間、並びに Cu^{2+} (1mM $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 0.5mM EDTA) もしくは EDTA (1mM EDTA) のいずれかの存在下において 62℃ で 24 時間インキュベートした。

全ての試料は、4℃ ではほとんどもしくは全く分解を示さない。これに対して、62℃ では幾らか分解し、これは銅の存在によって変動する度合いで増加する。62℃ での分解は、EDTA によって抑制される。

例 8

CAMPATH-1B の安定性に対するリン酸緩衝生理食塩水中の 2mM EDTA (pH 7.2) および 50mM クエン酸塩 (pH 6.0) の効果の間の比較を、種々のレベルの解で行なった。例 1 において言及されるタイプの CHO 細胞で産生される CAMPATH 1B (このバッチは原子吸光分光分析による測定で検出し得る銅を含有しない) を、リン酸緩衝生理食塩水で体積 10 に対して 1 に希釈した。アリコート 1ml を下記緩衝液 1 リットルに対して過剰した。

- (i) リン酸緩衝生理食塩水、pH 7.2;
- (ii) リン酸緩衝生理食塩水中 2mM EDTA、pH 7.2;
- (iii) 50mM クエン酸ナトリウム、pH 6.0。

過剰は、4℃ で、3 回交換しながら 16 時間にわたって行なった。次いで、緩衝液ブランクを用い、かつ吸光計数 A_{280} (0.1%) を 1.32 として 340nm ないし 200nm を走査することにより、3 つの試料についてタンパク濃度を測定した。

- (i) 1.32mg/ml
- (ii) 1.20mg/ml
- (iii) 1.27mg/ml

のタンパク濃度が測定された。

表 9

抗 体	% ピーク C			
	4°C EDTAなし	62°C EDTAなし	62°C + Cu^{2+}	62°C + EDTA
IgG1	0.54	1.58	5.59	1.1
C1H	0	2.49	27.98	0
CD4	0.4	1.91	21.52	1.84
IgG2	0	1.81	3.77	0

IgG1 - マウスモノクローナル IgG1 抗体、リン酸緩衝生理食塩水中 1mg/ml;

C1H - 例 1 に記載されるタイプの CAMPATH 1B、リン酸緩衝生理食塩水中 1mg/ml;

CD4 - CAMPATH 1B と同じフレームワーク領域を有し、CHO 細胞で産生されるヒト化抗 CD4 モノクローナル抗体、リン酸緩衝生理食塩水中 1mg/ml;

IgG2 - シグマ (Sigma) から市販されるマウス IgG2 モノクローナル抗体 1-4139、リン酸緩衝液から凍結乾燥されて供給され、水で 1mg/ml に再溶解した。

その後、上記緩衝液中の抗体のアリコート 200μl を、増加する濃度の $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (20mM まで) と共に、62℃ で 24 時間インキュベートした (62℃ は CAMPATH-1B の銅誘発開裂の最適温度である)。次いで、試料 (アリコート 50μl) を例 1 に記載される方法でサイズ排除 HPLC によって分析し、カラムから溶出される A_{280} - 吸光ピークのクロマトグラムを切断し、秤量することによって種々の画分を統合した。この場合、結果は % 「ピーク B」 (全 CAMPATH-1B) と記録した。

結果を下記表 10 に示す。

表 10

添 加 Cu (mM)	● ピーク B		
	PBS単体	PBS+2mM EDTA	50mM クエン酸塩
0	42.92	100	100
1	21.47	98.93	96.71
2.3	18.72	36.96	96.66
5.0	0	0	93.43
7.5	0	0	92.82
10	0	0	92.57
12.5	0	0	84.85
15	0	0	32.53
20	0	0	15.48

pH 7.2のリン酸緩衝生理食塩水単体におけるCAMPATH-1Bの開裂は、たとえ銅を添加しなくとも、62℃で24時間のインキュベーションの際には比較的早い。リン酸緩衝生理食塩水プラス 2mM EDTAにおいては、1mMより多量の銅が

ク B」(全 CAMPATH-1B)として記録される結果を下記表11に示す。

表 11

添 加 Cu (mM)	● ピーク B					
	PBS単体		PBS+2mM EDTA		PBS+2mM CIT	
	pH 7.2	pH 6.0	pH 7.2	pH 6.0	pH 7.2	pH 6.0
0	93.54	95.29	91.41	92.91	93.17	89.25
0.5	3.24	38.46	92.86	94.87	64.81	86.63
1.0	17.27	12.89	94.47	93.56	66.77	84.96
2.0	6.5	0	95.14	13	18.36	0.74
2.5	25	0	12.92	0	38.41	0.8
3.0	15.44	0	13.2	0	37.5	0.93

上記表は、2mM-EDTAおよび2mM-クエン酸塩によるCu²⁺の結合のおおよその化学量論およびpHの寄与効果を示している。リン酸緩衝生理食塩水、pH 7.2中の2mM-EDTAが、CAMPATH-1Bの開裂の抑制に最も

添加された場合に開裂が誘発される。50mMクエン酸塩、pH 6.0においては、10mMを超える銅が添加された場合に開裂が起こる。

例 9

例8と同様の実験でpHの変化の効果も調べた。リン酸緩衝生理食塩水中の、例1において言及されるタイプのCHO細胞において産生されるCAMPATH-1B(このパッチは原子吸光分光分析による測定で検出し得る銅を含有していない)を、リン酸緩衝生理食塩水、pH 7.2中に1:20に希釈した。その後、例8に記載されるようにタンパク濃度を測定し、リン酸緩衝生理食塩水、pH 7.2またはリン酸緩衝生理食塩水、pH 6.0でタンパク濃度2mg/mlに試料を希釈してpHをチェックした。CAMPATH-1B試料(pH 7.2もしくはpH 6.0のいずれかのリン酸緩衝生理食塩水中2mg/ml)の各々のアリコート200μlに4μlの0.1M-クエン酸三ナトリウム、pH 7.0もしくは4μlの0.1M-EDTA、pH 7.0のいずれかを添加し、クエン酸もしくはEDTAについて約2mMの最終濃度を得た。

CAMPATH-1B(2mg/ml)試料200μl当たり3mMまでの銅を、0.1M CuCl₂・2H₂Oのアリコート0ないし6μlとして添加した。水4μlを銅を除いて試料に添加した。試料を62℃で24時間インキュベートし、遠心してあらゆる沈殿物質を除去して、アリコート50μlを例8に記載される方法でサイズ排除HPLCにより分析した。%「ビー

有効である。結合の約1:1の化学量論は、pH 7.2で示される。2mMを超える濃度の銅は、2mM EDTAにおいてもCAMPATH-1Bの開裂を引き起こす。

国际调查报告

PCT/G8 92/01970

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		2. INFORMATION ON THE INVENTOR	
According to International Patent Classification (IPC) in its latest published Classification and IPC:		Name of Inventor(s):	
Int. Cl. 5 A61K39/395; G01N33/577; C12P21/08; //C07K3/28		Address of Inventor(s):	
3. FIELD OF SEARCH		4. FIELD OF SEARCH	
Classification Scheme		Classification Scheme	
Int. Cl. 5		C07K; A61K	
5. SUMMARY OF THE INVENTION			
Inventor's Name: ...			
6. ABSTRACT			
7. CLAIMS			
8. REFERENCES			
9. OTHER INFORMATION			
10. CERTIFICATION			
Date of the Patent Application		Date of Mailing of this International Search Report	
12 JANUARY 1993		08.02.93	
International Searching Authority		Signature of International Searching Authority	
EPO PATENT OFFICE		MOULI F. J. M.	

11. REFERENCES CITED TO BY THE INVENTOR		12. INFORMATION FROM THE INVENTOR	
Category 1:		Category 2:	
A		BIOTECHNOLOGY PROGRESS vol. 5, no. 3, September 1989, NEW YORK, USA pages 119 - 125 V. VELANDER ET AL. 'Process implications for metal-dependent immunoreactivity interactions.' see the whole document	
P. 1		US A. 5 087 695 (W. NEAULEY) 11 February 1992 see the whole document	

国际调查报告

G8 9201970
SA 65929

This report does not constitute a final report on the patentability of the invention. The information contained herein is for information only. The European Patent Office (EPO) is not responsible for the accuracy of the information contained herein. The European Patent Office (EPO) is not responsible for the accuracy of the information contained herein.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family number(s)	Publication date
EP-A-0591526	10-10-90	US-A- 4933435	12-06-90
		CA-A- 2010835	05-10-90
		JP-A- 2280990	30-11-90
US-A-5087695	11-02-92	None	

For more details about this report, see Official Journal of the European Patent Office, No. 11/93

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.